

# Биотехнологические коллекции растений и криобанки — важная часть Национального банка-депозитария живых систем

**Носов А. М.<sup>1</sup>, Юрин В. М.<sup>2</sup>, Спиридович Е. В.<sup>3</sup>,  
Высоцкая О. Н.<sup>4</sup>, Решетников В. Н.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация, [a\\_nosov@mail.ru](mailto:a_nosov@mail.ru)

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь, [Yurin@bsu.by](mailto:Yurin@bsu.by)

<sup>3</sup> Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, [a.spiridovich@cbg.org.by](mailto:a.spiridovich@cbg.org.by)

<sup>4</sup> Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Российская федерация [sruo@ippras.ru](mailto:sruo@ippras.ru)

**Резюме.** В последние десятилетия во многих странах возрос интерес к биотехнологическим коллекциям растительных объектов. Основная цель создания подобных коллекций — надежное сохранение растительного генофонда, прежде всего редких и исчезающих видов растений, а также видов, для которых традиционные методы хранения неэффективны. В практике создания, поддержания и использования биотехнологических коллекций существуют следующие основные направления: сохранение генетических ресурсов в пересадочных коллекциях (растения *in vitro*, культуры органов и клеток); депонирование растительных объектов при пониженных температурах и хранение растительных объектов в криобанках. В статье рассматриваются особенности и преимущества различных вариантов биотехнологических коллекций в рамках создания прототипа международного биотехнологического банка-депозитария живых систем.

**Plant Biotechnological collections and cryobanks are an important part of the National Bank — Depository of Living Systems.** Nosov A. M., Yurin V. M., Spiridovich E. V., Vysotskaya O. N., Reshetnikov V. N. **Summary.** In many countries the importance of plant biotechnological collections during recent decades have increased. The main goal of creating of such collections is the reliable preservation of the plant gene pool, especially rare and endangered plant species, as well as species for which traditional storage methods are ineffective. In the practice of creation, maintenance and use of biotechnological collections, the following main directions are existed: preservation of genetic resources in transplant collections (plants *in vitro*, organ and cell cultures); deposition of plant objects at low temperatures and storage of plant objects in cryobanks. The article examines the features and advantages of various variants of biotechnological collections within the framework of creating a prototype of an international biotech bank-depository of living systems.

Растения — необходимая часть жизни человека. Растения являются источниками ценных вторичных метаболитов, обладающих широким спектром биологического действия. Они применяются как в медицине, так и во многих отраслях пищевой и парфюмерно-косметической

промышленности. В настоящее время в мире используется несколько тысяч (в Китае — до 10 000) лекарственных и ароматических растений. Из них наиболее активно используется более 300 видов, из которых около 60 — специально выращивают на плантациях, а остальные — дикорастущие. В Беларуси сбор дикорастущего сырья ограничен, плантационно выращивается около 50 видов лекарственных растений, около 100 сортов культурной флоры (лекарственных, масличных, овощных, орехоплодных, ягодных и др.) зарегистрировано в Государственном реестре. Важно отметить, что запасы большинства лекарственных растений в природе ограничены, многие из них являются редкими или эндемичными. Следует сказать, что любое растение, используемое в коммерческих целях, становится потенциальным кандидатом на включение в группу видов, находящихся под угрозой исчезновения. Решить проблему дефицита сырья и сохранить в природе лекарственные растения могут разработки технологий плантационного возделывания или тепличное выращивание, а также новое, относительно недавно возникшее направление — клеточные биотехнологии. Таким образом, многие лекарственные растения относятся к редким или исчезающим видам, поэтому биотехнологические коллекции представляют большую ценность не только для экологических целей (сохранения видов), но и имеют большое экономическое значение [1,2].

Клетки и ткани «вне организма» можно сохранять как в живой пересадочной коллекции, так и депонировать (хранить) их при низких и сверхнизких температурах (в жидком азоте).

Существуют два принципиально различных подхода к коллекциям растительных объектов. Если важно сохранить уникальные генотипы (ценные сорта или разновидности растений), то нельзя допускать образования дедифференцированных клеток, т. е. возникновения каллусных клеток как *in vivo* (например, в процессе микроклонального размножения), так и *in vitro* (размножение через морфогенные каллусные культуры клеток). В противном случае, за счет соматической вариативности могут потеряться ценные свойства сорта. Для сохранения уникальных генотипов в качестве объектов хранения можно использовать пробирочные растения, органы или ткани растений.

При необходимости сохранения не конкретного генотипа, а генофонда вида возможно в качестве объектов хранения использовать морфогенные или эмбриогенные культур клеток. В качестве примера можно привести криосохранение в коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) эмбриогенных культур клеток эндемичных видов *Dioscorea caucasica* Lipsky и *D. balcanica* Kosanin (исчезающие виды диоскорея кавказская и диоскорея балканская). После криоконсервации культуры полностью сохранили способность к соматическому эмбриогенезу и из них были получены растения-регенеранты.

В ряде зарубежных стран сформированы и эффективно функционируют коллекции клеток, органов и растений, культивируемых *in vitro*. Кроме того, организованы криобанки, где в жидком азоте сохраняют образцы растительного материала, принадлежащего к разным систематическим группам. Многие коллекционные образцы, сохраняемые как национальное достояние, относятся к разряду редких и исчезающих растений, охраняемых законом.

В США (штат Орегон, Корваллис) функционирует National Clonal Germplasm Repository USDA, где сохраняют 500 000 образцов хозяйственно ценных, а также редких и исчезающих растений, принадлежащих к 10 000 видам. В основную коллекцию входят: актинидия (*Actinidia*), фундук (*Corylus*), цидония (*Cydonia*), земляника (*Fragaria*), хмель (*Humulus*), орех серый (*Juglans*), груша (*Pyrus*), смородина и крыжовник (*Ribes*), малина и ежевика (*Rubus*), голубика, черника, клюква (*Vaccinium*), а в малую коллекцию: клоны и семена ирги (*Amelanchier*), земляничного дерева (*Arbutus*), жимолость (*Lonicera*), клоны и семена бузины (*Sambucus*) и рябины (*Sorbus*), а также ещё ряда ценных пищевых и декоративных растений. В коллекции Корваллиса хранятся *in vitro* ряд лекарственных растений, например, шлемника трёх видов: *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Scutellaria lateriflora* L., *Scutellaria racemosa* Pers. [3].

Из Европейских коллекций можно отметить коллекцию в Германии, в которой поддерживают более 700 образцов различных линий клеточных культур, которые принадлежат к 80 раз-

личным семействам растений, причём большинство этих культур синтезируют фармакологически важные вторичные метаболиты [4].

Подобные коллекции существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше, Румынии, Японии, Индии, и в ряде других стран. Число биотехнологических коллекций постоянно увеличивается. Например, в 2008 году ФАО сообщило о существовании коллекции растительного материала в республике Палау (Каролинские острова), которая насчитывает ряд сортов таро (*Colocasia esculenta* L.) — 78 образцов; кассавы (*Manihot esculenta*) — 30 образцов; батата (*Ipomea batatas*) — 17 образцов; банана (*Musa*) — 12 образцов [5].

Российская коллекция клеточных культур, учреждённая в 1978 году, в настоящее время включает 9 коллекций, в том числе, две специализированные коллекции клеток высших растений и генетически трансформированных корней растений Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН [6]. Сейчас она насчитывает около 100 различных штаммов и линий культур клеток [7].

В 2005 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси получил Свидетельство на коллекцию асептических культур хозяйственно-полезных растений. Постоянно пополняясь, эта коллекция сегодня содержит 244 наименований растений: 75 видов и более 160 культиваров из 24 семейств. При этом более 65% таксонов в его составе относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства *Ericaceae* Juss. и *Orchidaceae* Juss. (Вересковые и Орхидные), некоторые представители которых внесены в списки CITES и Красную Книгу Республики Беларусь [8].

Как было сказано выше, часто депонирование образцов в коллекциях осуществляется помещением растительного материала в условия, тормозящие рост, деление и метаболизм его клеток, что позволяет реже менять питательные среды и потому существенно сокращать затраты на содержание коллекций вегетативно размножаемых растений [10, 11]. Этот приём, широко используется во всём мире, поскольку позволяет эффективно сохранять практически все клоны и сорта ценных плодовых, ягодных, декоративных и лекарственных культур [12, 13]. Однако, культивирование *in vitro* клеток, тканей и органов растений, с помощью периодических пересадок на свежие питательные среды, даже в режиме депонирования, имеет свои проблемы и недостатки, связанные, прежде всего с существованием некоторой вероятности потери образцов из-за реинфицирования, генетических изменений и даже потери морфогенного потенциала и жизнеспособности [14]. Затраты на содержание растущих коллекций растений *in vitro* многократно возрастают с увеличением продолжительности хранения образцов [15].

Поэтому, для снижения затрат на долговременное содержание коллекций ценного растительного материала, в том числе и культивируемого *in vitro*, и для уменьшения вероятности потерь ценных образцов в настоящее время в странах, членах ФАО, в том числе и в Российской Федерации, широко используют криосохранение [16, 17]. Криобанки, в которых растительный материал хранится в жидком азоте, или его парах при температурах ниже 170°C, являются наиболее надёжным способом сохранения растительных объектов. В настоящее время разработаны методы криосохранения для более 200 видов растений: неортодоксальных семян и тканей, культивируемых *in vitro* [9]. Криогенное хранение решает многие проблемы, возникающие при содержании коллекций растительного материала, однако применение этой технологии связано с необходимостью решения ряда новых проблем. В первую очередь это связано с необходимостью использования специального, сложного оборудования и технологий с помощью высококвалифицированного персонала [18,19].

Криобанк Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН был организован более 30 лет назад и был одним из первых в мире. Первым был разработан метод криосохранения меристем картофеля. К настоящему времени помимо меристем картофеля в этом криобанке хранятся меристемы около 30 сортов земляники нескольких сортов малины и черной смородины. Кроме того, в криобанке хранятся штаммы-продуценты вторичных метаболитов — культуры клеток различных видов женьшеня, полисциаса, люцерны, диоскореи..

Имеется ряд проблем долговременного культивирования и сохранения растительных объектов, в числе которых:

1. наличие в некоторых образцах сохраняемого материала, после его введения в культуру *in vitro*, условно патогенной (сопутствующей) микрофлоры, в том числе и латентных микроорганизмов [20, 21, 22];
2. вероятность возникновения изменений свойств сохраняемого растительного материала в процессе его длительного культивирования *in vitro* или хранения в жидком азоте:
  - снижение жизнеспособности из-за циклических изменений температуры от  $-96^{\circ}\text{C}$  до  $-130^{\circ}\text{C}$  при передвижении или переноске криосохраняемых образцов [23];
  - генетические изменения [24, 25, 26];
  - реинфицирование [20, 27, 28, 29];
  - биохимические изменения [30].

В 2016 г. стартовал проект Московского государственного университета «Научные основы создания Национального банка-депозитария живых систем» — «Ноев ковчег», который посвящен созданию многофункционального сетевого хранилища биологического материала. В рамках Национального банка-депозитария живых систем планируется работа с материалом всех возможных типов — от биологических молекул до целых живых организмов. Создание депозитария позволит сохранить биоразнообразие нашей планеты и создать новые способы его использования. Одной из задач является создание временного прототипа банка-депозитария живых систем для хранения и исследования собранного материала, в том числе биотехнологических коллекций и криобанков растений

Генофонд живых организмов представляет собой достояние планетарного уровня и его сохранение является приоритетной задачей государств и важнейшим направлением современной науки. Для выполнения этих задач необходимы межгосударственные усилия ученых и политиков. Представляется целесообразным распространение проекта «Ноев ковчег» на межгосударственный уровень, первой ступенью которого может быть сотрудничество в этом направлении России и Беларуси.

Этому будет способствовать то, что Россия и Беларусь уже имеют значительный опыт сотрудничества в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС — в рамках проекта «Инновационные биотехнологии» на 2011–2015 гг. совместными усилиями выполнено 4 задания (РФ: ГК № 16.М04.12.0003 и № 14.М04.12.0002; РБ: задание 1.3., 1.8).

Рассмотрение экономических аспектов, связанных не только с созданием коллекций растений *in vitro* для оперативного использования и сохранения их генофонда, но также и с формированием криобанков растений, предназначенных для долговременного сохранения генетического разнообразия культивируемых и дикорастущих растений, показывает безусловные перспективы этих направлений. При этом важно не только сохранять объекты, но и разрабатывать нормативную документацию по системам хранения, паспортизации и обмена/выдачи хранящихся объектов.

Особый интерес для работ в рамкой Международной кооперации представляет созданная коллекции асептических культур редких и эндемичных видов растений дикорастущей флоры стран СНГ (Беларуси, России, Кыргызстана) на основе природных источников и существующих коллекций *in vitro* стран ЕврАзЭС. Разработана общая методология комплексного изучения вопросов сохранения *in vitro* и практического использования эндемиков и редких видов растений, как компонента Национальной стратегии сохранения биоразнообразия растений в Беларуси, России, Казахстане и др. странах, актуальная для всех. Разработаны методы оценки параметров генетического разнообразия природных популяций для включения в коллекцию *in vitro*. Проведена работа по подбору сред для культивирования и депонирования редких и эндемичных видов растений, в том числе лекарственных. Разработаны и стандартизированы методы получения и анализа свойств (молекулярно-генетических, физиологических, цитогенетических, биохимических) культур *in vitro* высших растений для создания единой систе-

мы паспортизации. Данные о растениях вносятся в информационно-поисковую систему Hortus Botanicus Centralis — Info. (задание 1.8).

**Совместно разработаны и созданы:** национальные Коллекции культур *in vitro* высших растений биотехнологического назначения в РФ и РБ. По своему объему, представленному видовому разнообразию, спектру научного и прикладного применения коллекционных образцов они сравнимы с аналогичными коллекционными фондами ведущих российских и европейских центров растительных ресурсов и ориентированы на обеспечение исследований по приоритетным направлениям развития биотехнологии стран ЕврАзЭС. Оценивая значимость этого направления, можно сформулировать следующие перспективные направления дальнейших исследований:

- на региональном и национальном уровнях провести оценку состояния сохранения генофонда растительных объектов, в том числе редких и эндемичных видов растений, органов растений и культур клеток. Оценить наличие, необходимость и возможность создания и развития Национальных и Международных депозитариев для сохранения растительного генофонда;
- провести оценку методов и способов хранения генофонда растительных объектов дикорастущих видов (полевые коллекции, семенные банки, биотехнологические коллекции, криобанки и др) и разработать стратегию выбора оптимального метода (методов) хранения отбираемого для депонирования объекта в зависимости от его ботанико-физиологических характеристик;
- выявить редкие и эндемичные виды растений, в том числе продуценты промышленно-ценных БАВ, для приоритетного размещения в Депозитариях;
- в соответствии с разработанными алгоритмами и с учетом международных стандартов создать и/или расширить Национальные Депозитарии, включая биотехнологические коллекции и Криобанки;
- создать общие базы данных по Национальным Депозитариям России и Белоруссии с перспективой расширения и привлечения других стран-участников. Создать объединенный электронный каталог Депозитариев России и Беларуси (например документированный в системе EURISCO);
- оптимизировать и унифицировать с учетом Международных соглашений и стандартов правила депонирования, доступа и выдачи/обмена растительных объектов, сохраняемых в депозитариях, в том числе в биотехнологических коллекциях и Криобанках;
- в соответствии с унифицированными правилами депонирования, доступа и выдачи/обмена растительных объектов, создать Международный Депозитарий России и Белоруссии для сохранения генофонда растительных объектов дикорастущих видов, с перспективой расширения и привлечения других стран-участников.

Работы по созданию и оптимизации работ Международных депозитариев будут использовать опыт, полученный при выполнении четырех проектов Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии».

Полученные результаты могут быть использованы для проведения широкого спектра исследований в области биотехнологии: сохранение и изучение биоразнообразия, реинтродукция, получение возобновляемого растительного сырья. Кроме того, научные результаты могут быть востребованы различными исследовательскими, промышленными и учебными организациями. Создаваемые технологии призваны обеспечить объектами и сырьем реальные сектора экономики — производство фармацевтических препаратов, функциональных продуктов питания и нутрицевтиков, а также косметических и парфюмерных продуктов.

## Список литературы

1. Решетников, В. Н. Биотехнология растений и перспективы ее развития/ В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович, А. М. Носов// Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46, № 1. — С. 3–18.
2. Решетников, В. Н. Научные и практические аспекты развития биотехнологии растений в Республике Беларусь/ В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович// Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. — 2012. — Т. 7, ч. 1. — С. 69–83.
3. NCGR-Corvallis — *Fragaria Germplasm* [Электронный ресурс]// United States Department of Agriculture. — Режим доступа: <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11324>. — Дата доступа: 12.11.2014.
4. Cole, I. B. Protocols for establishment of an in vitro collection of medicinal plants in the genus *Scutellaria*/ I. B. Cole, F. T. Farooq, S. J. Murch// *Methods in Molecular Biology*. — 2009. — Vol. 547. — P. 155–165.
5. Catalogue of plant cell lines [Электронный ресурс]// Leibniz-Institut DSMZ. — Режим доступа: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-plant-cell-lines.html>. — Дата доступа: 12.11.2014.
6. Micropropagation and in vitro conservation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) in the Republic of Palau [Электронный ресурс]// United States Department of Agriculture. — Режим доступа: <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/193443.html>. — Дата доступа: 12.11.2014.
7. Клеточная биотехнология: учеб. пособие/ Г. П. Пинаев [и др.]. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. — 214 с.
8. Генетические и биологические (зоологические и ботанические) коллекции Российской Федерации [Электронный ресурс]// Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН). — Режим доступа: <http://www.sevin.ru/collections>. — Дата доступа: 12.11.2014.
9. Создание коллекции асептических культур хозяйственноценных растений с молекулярно-генетическим типированием образцов/ Е. В. Спиридович [и др.]// Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сб. ст. Междунар. науч. конф., Минск, 18–20 авг. 2014 г./ Нац. акад. наук Беларуси, Центр. ботан. сад; ред. В. Н. Решетников [и др.]. — Минск, 2014. — С. 228–230.
10. Cost action 871: cryopreservation of crop species in Europe [Электронный ресурс]// Ku Leuven. — Режим доступа: <http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>. — Дата доступа: 12.11.2014.
11. Aynalem, H. A. Non-destructive evaluation of in vitro-stored plants: a comparison of visual and image analysis/ H. A. Aynalem, T. L. Righetti, B. M. Reed// *In Vitro Cellular a. Developmental Biology-Plant*. — 2006. — Vol. 42, № 6. — P. 562–567.
12. Hussain, Z. In vitro corm induction and genetic stability of regenerated plants in taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott)/ Z. Hussain, R. K. Tyagi// *Ind. J. of Biotechnology*. — 2006. — Vol. 5, № 4. — P. 535–542.
13. Reed, B. M. Cold storage of strawberries in vitro: a comparison of three storage systems/ B. M. Reed// *Fruit Varieties J.* — 1992. — Vol. 46, № 2. — P. 98–102.
14. Алексеенко, Л. В. Влияние условий культивирования in vitro на дальнейшее поведение ex vitro растений земляники садовой (*Fragaria × ananassa* Duch.)/ Л. В. Алексеенко, О. Н. Высоцкая, В. А. Высоцкий// Плодоводство и ягодоводство России: [сб. науч. работ]/ Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. — М., 2005. — Т. 12. — С. 337–342.
15. Reed, B. M. Genetic stability of strawberries in culture/ B. M. Reed, K. E. Hummer// *Strawberry research to 2001: proc. of the 5 th North American strawberry conf.*/ ed.: S. C. Hokanson, A. R. Jamieson. — Alexandria, 2002. — P. 98–101.
16. Panis, B. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)/ B. Panis, M. Lambardi// *The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources: intern. workshop, Turin, Italy, 5–7 March 2005/ Food a. Agriculture Org. of the United Nations*. — Rome, 2005. — P. 1–12.
17. Reed, B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants/ B. M. Reed// *CryoLetters*. — 2001. — Vol. 22, № 2. — P. 97–104.
18. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences/ A. S. Popov [et al.]// *Intern. J. of Refrigeration*. — 2006. — Vol. 29, № 3. — P. 403–410.
19. Dussert, S. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections/ S. Dussert, F. Engelmann, M. Noirot// *CryoLetters*. — 2003. — Vol. 24, № 3. — P. 149–160.

20. Complementary conservation strategy for coconuts/ M. E. Dulloo [et al.]// *Coconuts genetic resources*/ ed.: P. Batugal, R. Rao, J. Oliver. — Malaysia, 2005. — P. 75–90.
21. Postman, J. Detection and elimination of viruses in USDA Hop (*Humulus lupulus*) germplasm collection/ J. Postman, J. DeNoma, B. M. Reed// *Acta Horticulturae*. — 2005. — Vol. 668. — P. 143–147.
22. Tanprasert, P. Detection and identification of bacterial contaminants from strawberry runner explants/ P. Tanprasert, B. M. Reed// *Plant Cell, Tissue a. Organ Culture*. — 1998. — Vol. 52, № 1/2. — P. 53–55.
23. Wongkaew, P. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission and oxytetracycline remission/ P. Wongkaew, J. Fletcher// *Plant Cell Rep.* — 2004. — Vol. 23, № 6. — P. 426–434.
24. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage/ I. P. Vysekantsev [et al.]// *CryoLetters*. — 2005. — Vol. 26, № 6. — P. 401–408.
25. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.)/ E. L. Peredo [et al.]// *Cryobiology*. — 2008. — Vol. 57, № 3. — P. 234–241.
26. Спектры ISSR — и REMAP-маркеров ДНК каллусов яровой пшеницы после этапов криосохранения по методу дегидратации/ А. И. Соловьёва [и др.]// *Физиология растений*. — 2011. — Т. 58, № 3. — С. 359–366.
27. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools/ B. M. Reed [et al.]// *In Vitro Cellular a. Developmental Biology-Plant*. — 2011. — Vol. 47, № 1. — P. 1–4.
28. Bielanski, A. Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens/ A. Bielanski// *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 63, № 7. — P. 1946–1957.
29. Wang, Q. C. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy/ Q. C. Wang, J.P. T. Valkonen// *J. of Virological Methods*. — 2008. — Vol. 154, № 1–2. — P. 135–145.
30. Morris, J. A simple assay system to monitor the potential for contamination during different stages of cryopreservation/ J. Morris// *Cryobiology*. — 2008. — Vol. 57, № 3. — P. 328.